

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-215398

⑬ Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	⑭ 公開	昭和62年(1987)9月22日
C 12 Q 1/26		8412-4B		
G 01 N 33/92		8412-4B		
// A 61 B 10/00		Z-8305-2G		
C 12 Q 1/44		N-7437-4C		
		8412-4B	審査請求	未請求
			発明の数	1 (全11頁)

⑮ 発明の名称 医療診断用指示要素として羊水中のホスファチジルグリセロールの量を測定する方法とそのキット

⑯ 特 願 昭62-976

⑰ 出 願 昭62(1987)1月6日

優先権主張 ⑱ 1986年1月6日 ⑲ 米国(US) ⑳ 816574

㉑ 発 明 者 マーレイ エー. ロー アメリカ合衆国 オハイオ州 44313 アークロン クリゼンタル
アブルツク ドライブ 530

㉒ 出 願 人 アイソラブ, インク. アメリカ合衆国 オハイオ州 44203 バーバートン ウスター ロード 5552

㉓ 代 理 人 弁理士 窪谷 剛至

明 細 書

1. 発明の名称

医療診断用指示要素として羊水中の
ホスファチジルグリセロールの量を
測定する方法とそのキット

2. 特許請求の範囲

1. 胎児肺成熟を診断するための医療診断用指示要素として、PG、すなわちホスファチジルグリセロールを測定する方法であって、羊水検体より前記PGの分散体もしくは溶液を形成せしめるようその羊水検体を処理し;

前記PG溶液より内因性グリセロール(endogenous glycerol)を除去し;

かかるPG溶液において、グリセロールをPGから分離させるようそのPG溶液を処理し、面して分離したグリセロールの濃度、すなわち前記羊水中のPG濃度を示すところの濃度を測定することからなるホスファチジルグリセロールの測定方法。

2. 前記羊水を表面活性剤又は物理的分解方

法により処理し、溶解化した前記PGを含む溶液にさせ、このPG溶液の形成の後に、かかる検体を濾過又は遠心分離もしくはそれらの組み合わせにより処理することからなり、かつ、ここで、少なくとも1つの酵素を使用する処理により前記溶液より内因性グリセロールを除去することからなる前記特許請求の範囲第1項記載のホスファチジルグリセロールの測定方法。

3. 前記の少なくとも1つの酵素が、ハイドロゲン ペルオキシド(hydrogen peroxide)を発生し、そのハイドロゲン ペルオキシドが、酵素、化学的還元剤又はレドックス カップラーの作用物質のうち少なくとも1つによって破壊されることからなり、かつ、ここで、グリセロール キナーゼ(glycerol kinase)及びグリセロホスフェイト オキシダーゼ(glycerol phosphate oxidase)を使用して前記ハイドロゲン ペルオキシドを発生させ、かつ、ここで、ペルオキシダーゼを使用することにより前記ハイドロゲン ペルオキシドを破壊するこ

とかなる前記特許請求の範囲第2項記載のホスファチジルグリセロールの測定方法。

4. 前記におけるPGよりグリセロールを分離する処理はグリセロール分離酵素によって行ない、かつ、ここで、該グリセロール分離酵素としてホスホリパーゼD (phospholipase D) を使用し、かつ、ここで、分離したグリセロールの濃度を少なくとも1つの酵素によって測定し、かつ、ここで、内因性グリセロールを溶媒より除去したあとも残留する少なくとも1つの酵素によって、該分離したグリセロールの濃度を測定し、かつ、ここで、前記の少なくとも1つの酵素がハイドロゲン ペルオキシドを発生し、このペルオキシドの濃度をペルオキシダーゼを使用することにより測定することからなる前記特許請求の範囲第1項記載の方法。

5. 前記の分離したグリセロールの濃度を、発色指示薬により発色させて検出し、発色した色を測定することからなり、かつ、ここで、ハイドロゲン ペルオキシドの濃度を発色指示

めキットであって、

(1)前記羊水を前記PGの溶液に形成するための羊水処理用界面活性剤を少なくとも1つ含有する試薬と、(2)かかるPG溶液より内因性グリセロールを除去することが可能な試薬と、(3)PGよりグリセロールを分離させることが可能な試薬と、(4)PGを含有する少なくとも1つの標準試薬とかなるキット。

8. 前記PG溶液を浄化するための濾過装置を含んでなる前記特許請求の範囲第7項記載のキット。

9. 溶液から内因性グリセロールを除去することが可能な前記試薬が少なくとも1つの酵素からなり、PGよりグリセロールを分離させることが可能な前記試薬が少なくとも1つの酵素からなる前記特許請求の範囲第7項記載のキット。

10. 溶液からグリセロールを除去することが可能な前記試薬にレッドックス カップラーが含まれてなり、PGよりグリセロールを分離させ

薬を使用することにより測定して、かつ、ここで、ペルオキシダーゼの活性を発色指示薬及びレッドックス カップラーによって測定することからなり、かつ、ここで、前記レッドックス カップラーとして2-(N-エチル-メタ-トルイディノ)-エタノール[2-(N-ethyl-meta-toluidino)-ethanol]を使用してなり、かつ、ここで、前記レッドックス カップラーとして、2-ハイドロキシ-3,5-ダクロロベンゼン サルフェネイト(2-hydroxy-3,5-dichlorobenzene sulfonate)を使用してなり、かつ、ここで、前記発色指示薬として4-アミノアンチピレン(4-aminantipyrène)を使用し、なる前記特許請求の範囲第1項記載の方法。

6. 前記検体より発色した色を、PG含有の標準試薬にて発色した色に比較させて、羊水中PG濃度を測定することからなり、該標準試薬にPGとグリセロール双方が含有されてなる前記特許請求の範囲第1項記載の方法。

7. 羊水検体におけるPGの量を分析するた

ることが可能な前記試薬に発色指示薬が含まれてなる前記特許請求の範囲第7項記載のキット。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は羊水中ホスファチジルグリセロール(phosphatidylglycerol)(以下PGと略す)の濃度を数値的に測定するための方法に関する。さらに詳しくは、胎児の肺成熟(fetal lung maturity)(以下FLMと略す)を診断するための医療診断用指示要素として羊水中PGを測定する方法に関する。

(従来の技術)

出産前に胎児が死亡する主な原因は、胎児の未熟からきていることは依然として変わらない。未熟新生児の死亡のうち50~70%は肺硝子膜症(hyaline membrane disease)が主な原因となっている。この肺硝子膜症は肺表面活性物質(pulmonary surfactant)の欠乏が原因となって起る。1971年にグルック アンド アソシエツ(Gluck and Associates)がアム、

ジェー、オブステト ジネコル(Am. J. Obstet Gynecol.)(109:440-445)の中で、羊水を分析し胎児肺表面活性物質を薄層クロマトグラフィー(TLC)を利用し、レシチンスフィンゴノエリン比(L/S比)を記録する方法を発表した。この検査方法は今なお、胎成熟の検査の基準となっている。

しかしながら、前記の薄層クロマトグラフィー検査はコストが高い上に測定に時間がかかり、しかも高度な熟練を要し、精度管理も極めて慎重に行なう必要がある。また、技術的に数多くの難問をかかえ、多くの場合L/S比の正確性に欠けていた。例えば、胎児を持つ妊婦が糖尿病、高血圧もしくは前期破水(premature rupture of membranes)にみまわれた場合、L/S比は不安定となり測定上信頼すべきものとなり得なくなる。従って、たとえL/S比が充分な値を出しそれによって胎児に呼吸障害の問題がないと判断できても、実際に糖尿病母体中の胎児に呼吸障害症候群(RDS)が発生する

及びアム。ジェー、オブステト ジネコル。(Am. J. Obstet Gynecol.)(145:474-480)。しかし、多くの場合、有機溶媒による抽出法が利用され、抽出に時間がかかり煩雑であった。しかも、使用される溶媒が危険で、リン脂質の回収率が100%以下に下ることが多い。その上、抽出物の乾燥処理後、有機溶媒の残留量が認められ、酵素を不活性化してしまう可能性がある。そこで、アナオカルその他の研究者たちは、クリン、ケム。(Clin. Chem.)(25:103-107)の中で、またアルティスその他の研究者たちは、マイクロクロム、ジェー。(Microchem. J.)(25:153-168及び24:239-258)の中で、両者ともに、羊水抽出法を利用せずに、酵素学的にレシチンを抽出する方法を発表した。この方法によれば、羊水検体は遠心分離法により浄化処理することもあればそのまま、浄化処理しないこともあった。しかし、前者の遠心分離処理を行なうとリン脂質物質が消滅し分析できなくなる。

という研究報告が多く見られる。

この他に胎成熟の検査法として、バブル試験もしくはシェイク試験並びに蛍光偏光測定法等が挙げられるが、これらの検査法は時折測定結果に誤差が生じる。

ホルマンその他の研究者たちは、ペディアトル、レス。(Pediatr. Res.)(9:396-402(1975))の中で、RDSにかかっている胎児の肺呼吸からPGが見出せない一方RDSから回復段階にある胎児にはPGが出現しているとの発表をしている。

それ故に、PGの値がFLMの度合を示す重要な指示要素と考える研究者が多い。これまで羊水中PGの測定に幾度ものクロマトグラフィー法(TLC)が使われてきたが、上述したように色々な欠点を有している。

また、レシチンとPGの定量測定が酵素学的に行なわれた。[クリン、ケム。(Clin. Chem.)(25:103-107;マイクロクロム、ジェー。(Microchem. J.)(24:239-258

また一方、後者の浄化処理しない場合の検体は吸光度による測定結果が安定性に欠け、あるいは誤差が生じることになる。そこで、アナオカルその他の研究者たちは後酵素抽出法を利用し、混濁の問題の除去を計ったが、かえって前記で述べたような欠点が生じる結果となった。

そこで、羊水PGの測定を今度は凝集反応検査法を導入して行なわれた。この検査法は迅速であり、PGに対して特異的である。

しかしながら、検査そのものが半定量的で、コストが高く、安定性に欠ける試薬(時間や温度によって不安定)を使用し、そのうえ操作技術の良し悪しにも影響する。

以上、PGが存在しているか消失しているかにより、胎児にRDSの恐れが実際あるか否かを判断できる。

従って、クロマトグラフィーを利用せずにPGの定量測定する方法のほうが目下広く使用されている薄層クロマトグラフィー測定法よりも秀れた点がある。

(目的)

本発明の目的は羊水中のPGの濃度を測定するための方法を提供することにある。

(構成)

本発明では、被測定検体として、経腹壁羊水穿刺(trans-abdominal amniocentesis)によって採集した羊水を一定量用重しておくのが最良であるが、経腔的に採集した検体でもよい。採集した羊水検体は、リボソマル(liposomal)凝集体もしくは膜状凝集体に含まれるPGを溶解化すべく処理する。すなわち、PG溶液を作成する。次に、こうして出来た粒子状もしくは綿状の検体を浄化処理する。このとき、後に行なう酵素分析に先立ち浄化処理を行なってしまうのが望ましい。

また、羊水検体をトリトン X-100(Triton X-100)水溶液などの表面活性剤によって処理し、検体から凝集物を除去して、溶解化することにより、PG溶液を作るか、もしくはPGを分散化するのが望ましい。このよう

に支障をきたさない程度とする。

かくして処理された羊水検体は、内因性グリセロールが除去され、次に他の種類の酵素すなわちグリセロール分離酵素(glycerol liberating enzymes)により該検体を処理し、PGからグリセロールを分離する。分離したグリセロールに発色指示薬すなわち、色原体を加えて、検査すると発色を起す。この時、発色した色を測定し、標準物質と比較し、羊水中のホスファチジルグリセロールの濃度を算出する。

(発明の実施例)

本発明の方法を実施する際、先ず妊娠より羊水検体を採取する。羊水検体の採取方法は経腹壁羊水穿刺でもよいし、従来の技術と手法により経腔的に検体を採取してもよい。

採集した羊水検体は検査用検体に処理するが、この処理は、リボソマル凝集体(liposomal aggregates)もしくは膜状凝集体(membranous aggregates)よりPGを分離する処理方法によって行なう。この際、表面活性剤と羊水検体とを

に、PGより凝集物を除去し溶液化する方法は他に、超音波分解法、機械的分解法、凍解サイクル法、突然解圧法並びに渦流混合法などがあり、どれでも利用できる。

こうしてPGを溶解化処理した後、遠心分離又は濾過により、粒子状物質ないし綿状物質を除去する。尚、濾過を利用する際は濾過媒体がPGを吸着しないよう注意しなければならない。また、浄化処理については酵素分析の間もしくはその後に行なってもよいし、または行なわなくともよい。さらには、濾過と遠心分離とを組み合わせてもよい。

次に、遊離グリセロール(free glycerol)を破壊する単一又は複数の酵素と上記の羊水検体を混合させ、一定時間インキュベートし、含有するグリセロール(glycerol)を一切除去する。この時、この遊離グリセロール破壊酵素と羊水検体との混合物の中に、補酵素(Coenzyme)、アクチベータ、エンハンサー、スタビライザー、抗凝固剤等も加えてよい。但し、おおむね、検査

混合する処理過程を設けることが望ましい。この混合処理は手作業でもよいし、渦流混合装置その他の混合装置によって行なってもよい。以上の検体処理に要する時間(混合処理時間及び完了時間を合わせた時間)は検体の状態、使用する表面活性剤の効果及び混合処理過程の効率の程度によって異なる。表面活性剤は、PGを溶解化できる^洗浄剤又は乳化剤もしくはその組み合わせ又は希釈したものでよい。

マックチェオン(McCutcheon)社の「乳化剤と洗淨剤」[ノース アメリカン エディション(North American Edition), 1983, エムシー パブリッシング カンパニー, グレンロック, ニュージャージー 07452 (McC Publishing Co., Glen Rock, New Jersey 07452)]によれば、多くの表面活性剤が挙げられている。そのどれもが、以後の酵素測定に支障をきたさない限り、上記の混合処理に適したものである。これらの表面活性剤の内どれを選択するかは、ホスファチジルグ

リセロールの溶解化にどの程度効率があるか、さらに後に続く分析に支障がないかが唯一の条件である。従って、使用する表面活性剤の効率が良ければ、それだけその使用量(容量)が少なく済む。その上、検体の希釈量を減らして検出感度を高めることができる。

尚、検査用検体を準備する方法としては、この他に、物理的に上記 P G 含有吸集体を分解する方法がある。この方法は表面活性剤を加えても加えなくても行なうことができる。この物理的分解を行なうには、凍解サイクル、超音波凍解装置、突然解圧並びに長時間及び／又は強力な混合等の公知方法により行なうことができる。

さて、準備した検査用検体は濾過処理又は遠心分離処理により、浄化するも任意である。この浄化処理を行なえば検査用検体は分光光度測定に適したものとなる。しかし、該検体から粒子状物質または結状物質が除去されている場合や、分光光度によらない測定法を扱う場合は、そのような浄化処理は不要である。この浄化処

それに次ぐ妨害物質としては、次の分析過程で反応する基質[例えば、グリセロール-3-ホスフェイト(glycerol-3-phosphate)及びペルオキシド(peroxide)]がある。

また、上述の酵素は、以後の発色過程で、P G 由来のグリセロールを色に変える機能を同時にそなえているものとする。この場合下記の酵素系が好ましい。(E, C, 番号は括弧に示す。)

グリセロール キナーゼ(glycerol Kinase)(2, 7.1.30)

グリセロホスフェイト オキシダーゼ(glycerophosphate oxidase)[E.C.番号なし。#アサインド(#assigned)]

ペルオキシダーゼ(peroxidase)(1.11.1.7)

グリセロール キナーゼ(GK)は、A T P を加えるとグリセロールをグリセロール-ホスフェイト(glycerol-phosphate)に変える。グリセロール ホスフェイト オキシダーゼ(G P O)は酸素を加えるとグリセロール-ホスフェイト

理は P G の溶解化工程の前に行なうことは出来るが、その場合 P G 分析成分が消失する可能性がある。そこで、酵素分析の間もしくはその後に浄化処理を行なってもよい。すでに述べたように、浄化処理は遠心分離法または濾過法のどちらでもよく、また両者を組み合わせた方法でもよい。また、遠心分離と濾過を同時に行ない検体を処理してもよい。濾過装置及び濾過媒体の選択については、所望の浄化力及び濾過速度を有していて、P G を吸着せず、後に続く分析に支障をきたさないものに限る。その他、検体を限外濾過法で処理することにより、以後の分析に妨害となるような微粒子並びにヘモグロビン等のタンパク質をもろとも除去してよい。

以上の如く調整した検査用検体を所定量用意し、すでに述べた所定の酵素を含む所定量の試薬と混合させ、一定時間インキュベートさせる。この混合物中、該酵素は、以後の分析に妨害となる物質を除去する機能を有するものとする。尚、主要な妨害物質としてグリセロールがある。

をデハイドロキシアセトン ホスフェイト(dihydroxyacetone phosphate)とハイドロゲンペルオキシド(hydrogen peroxide)とに変える。ペルオキシドはペルオキシダーゼ(P O D)によって水と酸素に変わる。

前記酵素含有試薬には、水、緩衝剤、食塩、補酵素、抗菌剤、溶解化剤、アクチベーター、エンハンサー、スタビライザーないしレドックス カップラー(redox coupler)を加えてもよい。レドックス カップラー(redox coupler)はペルオキシダーゼ指示要素に属する。このレドックス カップラーはペルオキシダーゼを比色測定用指示薬の成分に酸化結合させる機能がある。該比色測定用指示薬は前記妨害物質除去処理を終えたのち加えるものである。また、このレドックス カップラーは、妨害物質除去処理の間においては、非発色反応にてペルオキシドを消滅させる機能もある。従って、妨害物質除去処理中に存在または発生するいかなるペルオキシドをも消滅させることができ、次の

工程で使用する比色測定用指示薬系に妨害を与えない。さて、上記酵素を所定時間及び所定温度のもとで、上記妨害物質が完全に反応または除去するまで(ほとんどそれに近い位)インキュベートする。この場合、通常、 20°C ～ 50°C の温度で5～30分の時間が適当である。

この際、前記のインキュベートした混合物を同一分量のもとに2分量用意する。それには、2分量の検査用検体を同じ所定量の酵素によって処理するか、もしくは1分量の検査用検体を所定量の酵素により処理した後2つの等しい部分標本に分割するか、そのどちらでもよい。こうして分けた一方の1分量または1部分標本をブランク部分標本と表示し、他方の1分量または1部分標本を検体部分標本と表示しておく。

次に、酵素指示薬溶液(enzymatic indicator solution)を用意し、これに、前記酵素系の諸反応のうち1つの反応もしくはそれ以上の反応によって生じる酵素の活性を検出する試薬を含ませる。後う指示薬(比色測定用)としては、

一、エンハンサー及び/又はスタビライザーを加えてもよい。

さて、グリセロホスホリパーゼ酵素としては、ホスホリパーゼ D (E. C. 番号: 3. 1. 4. 4.) (phospholipase D (E. C. 3. 1. 4. 4.)) が望ましい。この酵素には、PGから基質(グリセロール)を発生させる機能があり、その基質は妨害物質除去処理中に残存する酵素に対して有効である。この残存する酵素は、検査用検体の部分標本に前記酵素指示薬溶液と別にもしくは一緒に加えたものである。(但し、ブランク部分標本に加えたものではない。)

次に、各々のブランク部分標本に所定量の酵素指示薬溶液を加える一方、酵素指示薬溶液とグリセロホスホリパーゼ酵素の所定量(この場合別々に用意してもよいし、混合してもよい)を各々の検査用検体部分標本に加える。しかる後、總ての部分標本を混合処理し、上述した如く所定温度の下に所定時間インキュベートする。この際、すでに述べたように酵素の活性が測定

酵素の活性がない時は無色状態を保ち、酵素の活性があった時は分光光度測定または肉眼測定の可能性を発色するものが望ましい。この指示薬は単一化合物であってもよく複合化合物の組み合わせであってもよい。また、該指示薬に2種類以上の化合物を使用する場合、その化合物のうち1種類以上をもとのグリセロール酵素試薬(glycerol enzyme reagent)に加えてもよい。(もしくは、検査用検体に直接加えてもよい。)

但し、この場合、上述の妨害物質除去処理の前に加えるべきで、しかも、その妨害物質除去処理の間においては、ほとんど又は完全に発色を起さないことである。酵素活性測定については、次のような公知の方法で行なってもよい。即ち、(1)反応速度論的方法(2)放射能化学的方法(3)蛍光測定方法(4)化学的発光法(5)比濁法及び(6)免疫学的方法。

かかる酵素指示薬溶液に、公知の緩衝剤、食塩、補酵素、抗菌剤、溶解放剤、アクチベータ

可能になる程度までインキュベートする。

尚、臨床化学分野において実際の現場でも用意しているような、管理物質(controls)及び/又は標準物質(standards)を本発明の実施にあたり使用してよい。これらの管理物質及び標準物質は、検体と並行して検体の測定方法と同じ方法により測定される。ところで、管理物質及び標準物質というのは、検査の有効性を確保し、確実に検査が正常に働きそして検体の測定値を算出できることを目的として使用されている。こうした管理物質及び/又は標準物質は、生物学的媒体及び/又は生物学的溶液に含まれる既知量の分析成分からなる。これら標準物質にも公知の緩衝剤、食塩、抗菌剤、可溶化剤、スタビライザー及び/又は異物材料すなわちグリセロールを加えてもよい。本発明による酵素学的PG分析においても、管理物質及び/又は標準物質を分析して測定値を出して検体の測定値と比較することができる。従って、検体中のPG濃度を数値的に算出することができるし、

またF L Mの定性的評価を行なうことが可能である。

検査にあたっては、各臨床検査研究所は一定の標準物質を用意し、二重チェックを行なえるようまた検査の正確さを最も効果的に得られるようにしておくことが肝要である。そのため、本発明の検査方法を実施するための試薬はキットとして販売されている。代表的なキットは下記の試薬から成っている。

(a) 半水中に含まれる総てのPGを分散状態又は溶解状態にすることが可能で、しかも分散状態又は溶解状態となったPGが濾過媒体を通過する時に媒体中にとどまることのないようにした、少なくとも1つの表面活性剤を含む試薬。

(b) 半水中に含まれる総ての内因性グリセロールを除去、破壊又はカップリングすることが可能な試薬。

(c) PGよりグリセロールを分離することが可能な試薬。

(d) PGを含む少なくとも1つの標準試薬。

を望むらくは、各々、 $0\text{ }\mu\text{M}$ 、 $2.5\text{ }\mu\text{M}$ 、 $5.0\text{ }\mu\text{M}$ よりなる複数の比較標準試薬を含んでなる。

さて、以下の実例により、臨床化学分野の習熟者が行なうところの本発明の実施をさらに例を示して説明する。

実例1

女性の妊婦より採取した羊水検体を充分に混合し、これを1分量とり、アルキルエトキシポリエトキシ エタノール(alkylethoxypolyethoxy ethanol)と分類される表面活性剤のトリトン X-100 (Triton X-100) [ローム

アンド ハース(Rohm & Haas)]を 50 g / L 含む溶液により処理する。この溶液は、A Fを10の割合に対し該トリトンX-100を1の割合で作成したものである。次に、検体を過流混合装置にて15秒間混合処理したのち5分間放置させ、再び混合処理した。こうして出来た検査用検体をガラス繊維紙を使用し濾過した。濾過した検査用検体は、 $500\text{ }\mu\text{L}$ の部分

尚、濾過装置を含めるも任意である

望むらくは、キットの中に充分な試薬が入っていて、通常、管状容器、バイアルもしくは同様な方法で密封された容器に詰められ、少なくとも1つのプランク及び1つの検体が測定できるようにするのがあればよい。従って、このようなキットには次のような試薬が備えられている。即ち、 $2-10$ 重量パーセント(望むらくは約 $3-6$ 重量パーセント)のトリトン X-100 (Triton X-100)のような表面活性剤水溶液からなる試薬1。試薬2はG P O、G K、又はペルオキシダーゼ等の乾燥グリセロール酵素の混合物からなり、グリセロール酵素再生試薬を一定量加えることにより再生可能なものである。試薬3はレドックス カップラーを含むグリセロール酵素再生試薬である。試薬4は、酵素ホスホリパーゼ D (P L - D)である。試薬5はペルオキサイドと反応し発色する発色試薬である。試薬6は濾過カラム又は濾過装置のオプションである。試薬7は、標準PG

標準にして、その部分標準2ヶを用意し(プランク1ヶと検体1ヶ)、これを試験管に注入した。そして、次の如く調整した標準試薬を夫々 $500\text{ }\mu\text{L}$ の部分標準にしたうえ、これを2組用意し、他の試験管に注入した。即ち、 $5\text{ g} / \text{L}$ トリトン T X-100水溶液に $0\text{ }\mu\text{M}$ のPGを含む標準試薬、同水溶液に $2.5\text{ }\mu\text{M}$ のPGを含む標準試薬及び同水溶液に $5.0\text{ }\mu\text{M}$ のPGを含む標準試薬。さらに、 $500\text{ }\mu\text{M}$ のグリセロール溶液を $500\text{ }\mu\text{L}$ の部分標準にし、これを2ヶ用意し、前記標準試薬2組の試験管の中に注入した。次に、総ての試験管の中に $500\text{ }\mu\text{L}$ のグリセロール酵素溶液を加えた。ここで使用したグリセロール酵素溶液には以下のものが含まれている。

トリトン X-100	5 g
トリス (Tris) [トリス(ハイドロキシメチル)アミノエタン [Tris(Hydroxyethyl)aminoethane]の略語]	18.2 g
C a c l ₂ · 2 H ₂ O	2.04 g

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1. 42g
 MEHA [2-(N-エチル- α -トリュディ
 α -ethanol)]の略語] 2. 24g
 $\text{ATP}_{23} \cdot \text{H}_2\text{O}$ [アデノシンリン酸(adenosine triphosphate)の略語] 1. 11g

GPO [アエロコッカス ウィリダニス(aero
 coccus viridans)由米の酵素] 9. 33KU
 POD (西洋わさび由米の酵素) 17. 6KU
 GK [ストレプトミセス クロモフスクス(streptomyces chromofuscus)由米の酵素] 1KU

また、上記グリセロール酵素溶液は濃塩酸によりPH7、Gに調整し、蒸留水で1リットルに希釈した。

以上の総ての試験管を混合処理し、30'の下で12分間インキュベートした。次に、50 μL のペルオキシダーゼ指示薬溶液をプランクの入った試験管の各々に加え、50 μL のホスファリパーゼD指示薬溶液を検体の入った試験管の各々に加えた。これらの指示薬溶液の成

分以下の通りである。

ペルオキシダーゼ指示薬溶液
 トリス 18. 2g
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2. 04g
 4-アミノアンチピリン 4. 08g
 (4-AAP)

このペルオキシダーゼ指示薬溶液は濃塩酸によりPH7、Gに調整し、蒸留水により1リットルに希釈した。

尚、ホスホリパーゼD指示薬溶液にはさらに、ストレプトミセス クロモフスクス由米のホスホリパーゼDを133. 4KU/Lを含ませた。

次に、総ての試験管を混合処理し、37'の下にもう12分間インキュベートした。しかるのち、各々試験管の吸光度を550nmの波長で分光光度計により測定した。吸光度の測定結果は次の通りであった。

A		B	
番号	検体	ブランク	検体の B-A PG(μH)
の吸光度 吸光度			

1	AF	.039	.102	.083	2.39
2	0 μH のPG				
	標準試薬	.021	.089	.048	-0.17
3	2.5 μH のPG				
	標準試薬	.019	.084	.085	2.72
4	5.0 μH のPG				
	標準試薬	.021	.099	.078	4.89
5	500 μH の				
	グリセロール	.023	.072	.049	0.08

尚、上記のPG(μH)の濃度は線形回帰分析法により上記の3つの標準試薬を使用し測定した。グリセロールは本分析の妨害とならなかった。

実例2

AFからのPG回収率が濾過処理がどの程度効果があるかを調べた。半水27検体を採集し、2つの検査条件の下に上記例1のように測定した。すなわち、管理試薬の条件として、上記実例1に従い濾過処理を行なった。

また、実験の条件として、次に行なうインキュ

ベーション過程で完了した後はじめて濾過処理を行ない、その直後に分光光度定量測定を行った。

この結果は添付図面に示すグラフの通りである。即ち、濾過処理の前あるいは後にPGを半水に加えた場合の測定値はほぼ直線となった。この測定値を線形回帰分析($n=27$)により処理すると、相関係数は0.992となり回帰線方程式は $Y=0.9359X+0.497$ となる。15 μM PG($n=21$)より低い値では、相関係数は0.954となり、回帰線方程式は $Y=1.001X+0.149$ となる。即ち、後者の濾過処理では、表面活性剤を加えた場合、検査用検体よりPGを取り出すことはできないことを示す。

実例3

AFの検体を充分に混合処理し、その部分標本を複数用意して、下記条件にて各々処理した。

部分標本	処理条件
------	------

A	濾過後50g/LのトリトンX-100
---	--------------------

- 水溶液により10%希釈。
- B 1000Xgにて10分間遠心分離したのち、50g/LのトリトンX-100水溶液により10%希釈。
- C 50g/LのトリトンX-100水溶液を混合したのち濾過処理。(上記実例1に従う。)
- D 50g/LのトリトンX-100水溶液を混合したのち1000Xgにて10分間遠心分離処理。
- E 50g/LのトリトンX-114水溶液を混合したのち濾過処理。(上記実例1に従う。)
- F 50g/Lのブルロニク L-35(注)(P luronic L-35)を混合したのち濾過処理。(上記実例1に従う。)
- (注)BAS F Wyandotte社(BA S F Wyandotte)製の表面活性剤
- 以上の如く処理した検体に対し、上記実例1

の方法によりPGの測定を行なった。

結果は下記の通り。

部分標本	PG (μ M)
A	6.45
B	6.99
C	8.51
D	8.21
E	8.36
F	8.21

上記結果により、浄化処理の前に表面活性剤による処理を行なうと、A FからのPG回収率が良くなることが判る。

また、トリトンX-100に代わって他の表面活性剤も使用できることも判る。

変例4

上記実例1と同じ手順で行なったが、ペルオキシダーゼの活性を表示できる別の試薬を使用した。即ち、実験上の条件は上記実例1と同一だが、下記の異なった試薬を使用している点が相違する。

実験A:同一モル濃度(12.5mM)にて、MEHAに代えて、ソディウム2-ハイドロキシ-3,5-ジクロロベンゼンサルファネイト(Sodium 2-hydroxy-3,5-dichlorobenzenesulfonate)(HDCBS)を使用した。510nmにて吸光度を測定した。

実験B:同一モル濃度(12.5mM)にて、MEHAに代えて、3-ハイドロキシ-2,4,6-トリブロモベンゾイックアシド(3-hydroxy-2,4,6-tribromobenzoic acid)を使用した。513nmにて吸光度を測定した。

実験C:同一モル濃度(20mM)にて、4-APAに代えて、3-メチル-2-ベンゾチアゾロン-6-ヒドラゾンハイドロクロライド(3-methyl-2-benzothiazolone-hydrazone hydrochloride)を使用した。590nmにて吸光度を測定した。

以上の実験で、吸光度の測定結果は、表を作成して示す。以後の実験手順は上記実例1のものに従った。

	A	B	B-A	0 μ MのPG
実例 検体	ブドウの	検体		標準試薬
番号	吸光度	吸光度		と5 μ MのPG標準試薬との差
1 0 μ MのPG	.021	.089	.048	
標準試薬				
1 5 μ MのPG	.021	.099	.078	.030
標準試薬				
1 500 μ Mの	.023	.072	.049	
グリセロール				
4A 0 μ MのPG	.038	.080	.042	
標準試薬				
4A 5 μ MのPG	.037	.113	.076	.034
標準試薬				
4A 500 μ Mの	.078	.111	.033	
グリセロール				

48 0 μ M の PG .082 .118 .034

標準試薬

48 5 μ M の .082 .137 .055 .021

グリセロール

48 500 μ M の .101 .134 .033

グリセロール

4C 0 μ M の PG .140 .183 .043

標準試薬

4C 5 μ M の PG .142 .249 .107 .064

標準試薬

4C 500 μ M の .133 .157 .024

グリセロール

上記の測定結果より、他のカップラー及び発色指示薬が使用できることが判る。

表例 5

上記表例 4 の実験 A と同一の手順で行なった。しかし、HDCBS を発色試薬 (12.5 mM) に含有させ、グリセロール標準試薬には含有させなかった。さらに、各標準試薬に 50 μ M のグリセロールを加え模擬的な内因性羊水グリセ

の検体を用意し、これを 1 本の試験管に注入した。そして、次のように調整した複数の標準試薬をそれぞれ 200 μ L 用意し、各々の試験管に注入した。即ち、5 g/L のトリトン X 溶液に 0 μ M の PG を含有させた標準試薬、同溶液に 2.5 μ M の PG を含有させた標準試薬及び同溶液に 5.0 μ M の PG を含有させた標準試薬。

さらに、500 μ M のグリセロール溶液を 1200 μ L 用意し、これを 1 本の試験管に注入した。次に、1200 μ L のグリセロール標準溶液を各試験管に加えた。以上の試験管を混合処理し 37°C の下に 12 時間インキュベートした。そして、これらの試験管より、各々 500 μ L の分量を 2 分量取り (ブランクの部分標本と検体の部分標本)、別々の試験管に注入した。以後、上記の実例 1 に従い測定をおこなった。

吸光度の測定結果は以下の通りであった。

吸光度

ロールを得ようとした。吸光測定値は次の通りとなった。

検体

吸光度

	A B		
	ブランク	ブランク	A-B
0 μ M の PG 及び 50 μ M のグリセロール	.216	.248	.032
5 μ M の PG 及び 50 μ M のグリセロール	.219	.248	.029
500 μ M のグリセロール	>3.0	>3.0	—

以上により、妨害物質除去処理中に残留または発生する物質を破壊するには、インキュベーション以前の過程でカップラー (HDCBS) を加えなければならない。もし、そのように処理しないと、もともと存在している内因性グリセロールが発色試薬を加える過程で、発色してしまうことになる。

表例 6

手順は上記表例 1 のものに沿って行なったが、次のように変更を加えた。即ち、1200 μ L

番号	検体	A B		
		ブランクの吸光度	検体の吸光度	B-A 検出された PG (μ M)
1	AF	.081	.101	.040 3.37
2	0 μ M の PG			
	標準試薬	.023	.049	.026 0.04
3	2.5 μ M の PG			
	PG 標準試薬	.024	.080	.034 2.42
4	5.0 μ M の PG			
	PG 標準試薬	.026	.073	.047 5.04
5	500 μ M の			
	グリセロール	.029	.054	.025 — 0.20

この結果により、第 1 回のインキュベーションは 1 本の試験管で行なうことができ、然るのち検体用試験管とブランク用試験管に分け、表例 1 に従い測定することができる。

以上、現在の特許の状況に則し本発明の最上の形態と好ましい実施態様を詳細に表わしかつ説明したが、本発明はそれに限定するものでは

なく、その範囲は添付したクレームに定められている。

4. 図面の簡単な説明

添付の図面は、酵素インキュベーションがP
Gの分析精度に影響を及ぼさない程度まで濾過
した状態を示すグラフである。

